

PCT/JP00/06222

日本国特許庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

12.09.00

JP00/6222

EKU  
09/856979

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。  
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

1999年 9月30日

REC'D 27 OCT 2000  
WIPO PCT

出願番号  
Application Number:

平成11年特許願第279307号

出願人  
Applicant(s):

日本たばこ産業株式会社

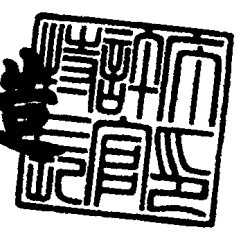
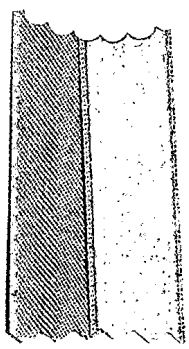
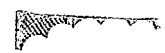
PRIORITY  
DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年10月13日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及川耕造

出証番号 出証特2000-3083242



【書類名】 特許願

【整理番号】 991862

【提出日】 平成11年 9月30日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県磐田郡豊田町東原700番地 日本たばこ産業株式会社 遺伝育種研究所内

【氏名】 浜田 和行

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県磐田郡豊田町東原700番地 日本たばこ産業株式会社 遺伝育種研究所内

【氏名】 中木戸 文夫

【特許出願人】

【識別番号】 000004569

【氏名又は名称】 日本たばこ産業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100089705

【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所

【弁理士】

【氏名又は名称】 社本 一夫

【電話番号】 03-3270-6641

【選任した代理人】

【識別番号】 100071124

【弁理士】

【氏名又は名称】 今井 庄亮

【選任した代理人】

【識別番号】 100076691

胞、特に蕈中でRNaseとして作用し、細胞中でのタンパク質の生合成を阻害する酵素の遺伝子は、いずれも本発明の目的に使用可能である。それらの例は、脾臓由来のRNase A、*Aspergillus oryzae*由来のRNase T1、*Streptomyces aureofaciens*由来のSarnase (EP 公開特許053799号公報)等である。

## 【0014】

RNase遺伝子上流に結合するプロモーター（第一のプロモーター）は、植物細胞中で、使用する特定のRNase遺伝子の発現を誘導する任意のプロモーターである。それらの例は、タバコのTA29プロモーター(J. Seurinck et al., Nuc. Acid. Res., 18, 3403, 1990)、アラビドプシスのA9プロモーター(Wyatt Paul et al., Plant Mol. Biol., 19, 611-622, 1992)などである。好ましくは、第一のプロモーターは雄性不稔性にすべき植物の蕈に特異的なプロモーターであり、イネについては蕈特異的なプロモーターとして、E1プロモーター、T72プロモーター、T42プロモーター（いずれもW09213956号公報記載）、Osg6Bプロモーター、Osg4Bプロモーター（いずれもT. Tsuchiya et al., Plant Mol. Biol. 26, 1737-1746, 1994）等が知られている。E1プロモーターの配列は配列番号6に示されている。

## 【0015】

第一のプロモーターは断片として使用することが重要である。本明細書中で、第一のプロモーターに関して断片というときは、天然に存在するプロモーターの配列と少なくとも一部が相違することを意味し、例えば、介在配列により前後に分断されている場合も含めて、3'領域、内部領域、および／または5'領域に欠失、置換または挿入が存在するプロモーターである。このような欠失、置換、挿入の結果、本来のプロモーター配列と90%程度まで相違する断片が好ましく、さらに好ましくは70%程度まで相違する断片が好ましく、特に好ましくは50%程度まで相違する断片が好ましい。第一のプロモーターの断片として好ましい具体例の一つは、E1プロモーター由来の、配列番号7に示す断片である。この配列中の塩基の1ないし数個が置換、欠失または挿入により修飾された配列も、配列番号7に示す断片と同様のプロモーター活性を有するかぎり、第一のプロモーターの断片として好ましい。

## 【0016】

第一のプロモーターの断片は、RNase遺伝子の上流に機能可能に結合して使用する。機能可能とは、プロモーター要素がRNase遺伝子の発現を誘発することができる位置関係を意味する。

【0017】

本発明においては、RNase阻害蛋白質遺伝子を使用することも重要である。これは使用するRNase遺伝子に応じて適宜選択され、例えばRNase遺伝子がバルナーゼ遺伝子である場合に、好ましいRNase阻害蛋白質遺伝子はバースター遺伝子である。RNase阻害蛋白質遺伝子の上流には、第二のプロモーターを機能可能に結合する。第二のプロモーターは植物細胞中で、使用するRNase阻害蛋白質遺伝子の発現を誘発するものであり、第一のプロモーターと同じであっても異なってもよい。但し、第一のプロモーターと同じものを用いる場合、必ずしも断片として使用することは要しない。

【0018】

本発明の方法により雄性不稔化することができる植物は特に限定されないが、例えば、イネ、トウモロコシ、タバコ、レタス、ナタネ等を挙げることができる。特に、イネおよびトウモロコシが好ましい。

【0019】

本発明において植物を雄性不稔化するために、植物細胞のゲノムに遺伝子を導入するための方法は、アグロバクテリウム法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法などがある。好ましい方法はアグロバクテリウム法である。その具体的方法は、例えばPCT国際公開W092/13957に記載の方法を参照して、当業者が適宜決定してよい。一例を示せば、次の工程により植物細胞のゲノムに遺伝子を導入することができる：

- (1) 第一のプロモーターの断片を用意し、
- (2) RNase遺伝子を用意し、
- (3) 第一のプロモーター断片の下流にRNase遺伝子を機能可能に結合し、
- (4) 第二のプロモーターを用意し、
- (5) RNase 阻害蛋白質遺伝子を用意し、
- (6) 第二のプロモーターの下流にRNase阻害蛋白質遺伝子を機能可能に結合し

(7) 第一のプロモーター断片の下流に結合したRNase遺伝子および第二のプロモーターの下流に結合したRNase阻害蛋白質遺伝子を、制限酵素部位を利用してT-DNAに組み込み、

(8) 工程(7) のT-DNAを、Tiプラスミド中に存在させ、

(9) 必要であれば、工程(8) のTiプラスミドをアグロバクテリウム細菌中で増幅し、

(10) 工程(9) のアグロバクテリウム細菌を、植物細胞に感染させて、第一のプロモーター断片の下流に結合したRNase遺伝子および第二のプロモーターの下流に結合したRNase阻害蛋白質遺伝子を、該植物細胞のゲノムに導入する。

#### 【0020】

形質転換した植物細胞は、カルス培養から出発して完全な植物体に再生することができる。その方法は、例えばY. Hiei et al., Plant J. 6, 271-282: 1994に記載されている。

#### 【0021】

上記工程において、第一のプロモーターの断片の調製は、第一のプロモーターを適当な制限酵素で切断することにより行ってもよく、あるいは、後記実施例に示すように、第一のプロモーターとRNase遺伝子を含むプラスミドから、PCRにより、プライマーを適宜選択して不要な領域を除いた配列のみを増幅させてもよい。また、上記工程、特に(1)～(7)の順序や、材料を適宜変更することは本発明の範囲内である。また、第一のプロモーター断片の下流に結合したRNase遺伝子と第二のプロモーターの下流に結合したRNase阻害蛋白質遺伝子を、別々に組み込んだT-DNAを含む、別々のTiプラスミドを用いて、植物細胞の形質転換を行うこともできる。さらに、上記工程(7)のT-DNAに予め選抜マーカを含めておけば、目的の遺伝子が導入されたカルスの選抜を容易にすることができる。そのようなマーカの例として、後述の実施例で用いるBar遺伝子、あるいはハイグロマイシン耐性(HPT)遺伝子が挙げられる。しかし、選抜マーカの使用は必須ではなく、形質転換植物細胞から生じたカルスから再生した植物が雄性不稔化されていることを、形質転換が達成されたことの指標としてもよい。

【0022】

本発明は、上記アグロバクテリウム法により、植物細胞のゲノムに目的の遺伝子を導入するためのベクターも提供する。該ベクターは、i) プロモーターの断片とそれにより発現誘導されるRNA分解酵素遺伝子、およびii) 前記プロモーターと同一又は異なるプロモーターとそれにより発現誘導されるRNA分解酵素阻害蛋白遺伝子、を含むT-DNAを有し、植物細胞に感染したアグロバクテリウム細菌中に存在するとき該植物細胞のゲノムに前記T-DNAを導入することができるベクターである。好ましくは、本発明のベクターは、植物形質転換用のTiプラスミドに、上記i)およびii)の遺伝子要素を含むT-DNAを組み込んでなるものである。植物形質転換用のTiプラスミドは、種々のものが知られまた入手可能であるが、例えば、LBA4404株の持つpAL4404が挙げられる。本発明のベクターは、必要に応じて、アグロバクテリウム細菌中で増幅するための複製開始点、RNA分解酵素遺伝子およびRNA分解酵素阻害蛋白遺伝子の各下流のターミネーター、および／または形質転換された植物細胞の選抜のために適するマーカー遺伝子の一つ以上を含んでもよい。

【0023】

本発明はさらに、i) プロモーターの断片とそれにより発現誘導されるRNA分解酵素遺伝子、およびii) 前記プロモーターと同一又は異なるプロモーターとそれにより発現誘導されるRNA分解酵素阻害蛋白遺伝子を、本発明の方法でゲノムに導入されて含む形質転換植物細胞、および該細胞から再生された雄性不稔植物も提供する。

【0024】

【発明の効果】

上流部の欠失により活性の低減されたプロモーターにバルナーゼ遺伝子を結合し、さらにイネ蒴特異的プロモーターに結合されたバースター遺伝子を同時導入することにより、従来のコンストラクトでみられた形態や開花特性の異常の少ない雄性不稔植物の作出が可能になった。

【0025】

以下、実施例に基づいて、本発明を詳細に説明するが、本発明は実施例のみに

限定されるものではない。

【0026】

【実施例】

実施例

E1プロモーターの断片の下流に結合したバルナーゼ遺伝子を増幅させるための鋳型としてプラスミドpTS172 (特願平10-220060) を使用した。プライマーとして内部にPstI切断部位を持つ172del-F (配列番号 1) と172del-R (配列番号 2) を用いて、PCR 法により増幅を行なった後、制限酵素PstIで処理した。その結果、両端にPstIの粘着末端を持ち、かつpTS172のE1プロモーターのうち翻訳開始点の上流約360bp を残してそれ以外を欠いた断片が得られた。この断片の両端をを常法によりT4 DNAライゲースによって結合することで再び環状化し、新規のプラスミドpTS172Δ (配列番号 3) とした。

【0027】

pTS172ΔのPstI部位にE1プロモーター (PCT出願国際公開第9213956 号) とバースター遺伝子 (R.W.Hartley J.Mol.Biol. 202, 913-915 : 1988) を結合した断片 (配列番号 4) を平滑化して組み込み、これをpTS346 (配列番号 5) とした。pTS346の構造を、図1に模式的に示す。

【0028】

pTS346から制限酵素EcoRI により、5.5 kbの断片を切り出し、pSB11BS (構造はすぐ後に説明する) のEcoRI 部位に挿入し、更に相同組換えによりそのT-DNA領域をacceptor vector pSB1 (T.Komari et al., Plant J.10, 165-174:1996) に組み込んだ。この組換え型プラスミド (pSB1346) を持つ *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 をイネ (品種朝の光) の形質転換に用いた。pSB11BS は中間ベクター-pSB11 (T.Komari Plant J. 10, 165-174:1996) のStuI部位にバースター遺伝子 (R.W.Hartley J.Mol.Biol. 202, 913-915 : 1988) を組み込んだものである。

【0029】

この組換え型プラスミドをもつ *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 をイネ (品種アサノヒカリ) に形質転換した。形質転換の方法は、基本的にHieiらの方法 (Hiei et al., Plant J. 6, 271-282:1994) に従ったが、構築した雄性不稔遺伝

子が選抜マーカーとしてbar 遺伝子 (phosphinothricin acetyl transferase をコードする) を含んでいるので、遺伝子が導入されたカルスを選抜するためにphosphinothricin (濃度10 mg/L) を用いた。

【0030】

通常の長さのE1プロモーターを利用し、かつバースター遺伝子は使用していないコンストラクトpSB1172 (1999年8月3日出願の、PCT/JP99/04167明細書参照) を導入した場合と比較すると、形質転換の効率、形態の正常な形質転換体の割合は表のように顕著に改善された。

【0031】

【表1】

表：形質転換効率

	感染カルス数	再分化 カルス数	PCR 陽性 系統数	形態の正常な 雄性不稔系統数	
pSB1346	681	45	37/38*	15/37	40.5%
pSB1172 (対照)	2838	83	52/83	9/52	17.3%

\*:45 系統のうち38系統を調査

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Tobacco Inc.

<120> Method for producing male-sterile plant



<130> 991862

<160> 7

<210> 1

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer 172del-F

<400> 1

ggctgcagtg cggccgctag cctaggcccg ggcccacaaa aatctg

46

<210> 2

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer 172del-R

<400> 2

gggctgcagt cagccagcca gaccaatggg ggcaaaattt ac

42

<210> 3

<211> 5228

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Plasmid pTS172Δ

<400> 3

```

aattcaagct tgacgtcagg tggcactttt cggggaaatg tgcgcggaac ccctatttgt 60
ttatTTTTtct aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg 120
cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt cgcccttatt 180
ccctTTTTtTg cggcattttg ccttcctgtt ttgtctcacc cagaaacgct ggtgaaagta 240
aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc 300
ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag cactttttaa 360
gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg ggcaagagca actcggtcgc 420
cgcatacact attctcagaa tgacttgggt gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt 480
acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgcTgcca taaccatgag tgataacact 540
gcgGCCaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg agctaaccgc tttttTgcac 600
aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac cggagctgaa tgaagccata 660
ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg caacaacgtt gcgcaaacta 720
ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat taatagactg gatggaggcg 780
gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg ctggctggtt tattgctgat 840
aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggt 900
aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc aggcaactat ggatgaacga 960
aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc atttgtaact gtcagaccaa 1020
gtttactcat atatacttta gattgatitaa aaacttcatt ttttaatttaa aaggatctag 1080
gtgaagatcc tttttggctc gagtctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc 1140
cactgagcgt cagaccccggt agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc ttttttctg 1200

```

cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaaa ccaccgctac cagcgggtggt ttgtttgccg 1260  
 gatcaagagc taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca 1320  
 aatactgtcc ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg 1380  
 cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta ccagtggttg ctgccagtgg cgataagtcg 1440  
 tgtcttaccg gggttgactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga 1500  
 acgggggggtt cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac 1560  
 ctacacgctg agcattgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat 1620  
 ccggtaaagc gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc 1680  
 tggatcttt atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga 1740  
 tgctcgtcag gggggcgagg cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt ttacggttc 1800  
 ctggcctttt gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg 1860  
 gataaccgta ttaccgcctt tgagttagct gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag 1920  
 cgcagcgagt cagttagcga ggaagcggaa gagcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc 1980  
 gcgcgttggc ctgatcagaa ttcataatgca cgtgttcccc atctagtaac atagatgaca 2040  
 ccgcgcgcga taatttatcc tagtttgccg gctatatatt gttttctatc gcgtattaaa 2100  
 tgtataattg cgggactcta atcataaaaa cccatctcat aaataacgtc atgcattaca 2160  
 tgtaattat tacatgctta acgtaattca acagaaatta tatgataatc atcgcaagac 2220  
 cggcaacagg attcaatctt aagaaacttt attgccaaat gtttgacga tctgcttcgg 2280  
 aggttacctt atctgatttt tgtaaaggtc tgataatggt ccgttgtttt gtaaatacagc 2340  
 cagtcgcttg agtaaagaat ccggtctgaa tttctgaagc ctgatgtata gttaatatcc 2400  
 gcttcacgcc atgttcgtcc gcttttgccc gggagtgtgc cttccctgtt tgagaagatg 2460  
 tctccgccga tgcttttccc cggagcgacg tctgcaagg tcccttttga tgccaccag 2520  
 ccgagggctt gtgcttctga ttttgtaatg taattatcag gtagcttatg atatgtctga 2580  
 agataatccg caaccccgtc aaacgtgttg ataaccggt ccatcgcgac ggcttgatgg 2640  
 atctcttgct ggacaccggg atgctaggat gggttatcgt ggccggcgtg cgtgtgtggc 2700  
 tttttaggc gccggcgacg gcgggggcaa tgtggcaggt gagtcacggt gcaagcgtgc 2760  
 gcaagtgact gcaacaacca aggacggtca tggcgaaagc acctcacgcg tccaccgtct 2820  
 acaggatgta gcagtagcac ggtgaaagaa gtgttgtccc gtccattagg tgcatctca 2880  
 ccgttgcca gaacaggacc gttcaacagt taggttagt gtaggacttt tacgtggta 2940

atgtatggca aatagtagta aattttgccc ccatttgtct ggctgactgc aggcggccgc 3000  
 tagcctaggc ccgggcccac aaaaatctga gcttaacagc acagttgctc ctctcagagc 3060  
 agaatcgggt attcaacacc ctcatatcaa ctactacgtt gtgtataacg gtccacatgc 3120  
 cggatatatac gatgactggg gttgtacaaa ggcggcaaca aacggcgttc ccggagtgc 3180  
 acacaagaaa ttgcccacta ttacagaggc aagagcagca gctgacgcgt acacaacaag 3240  
 tcagcaaaca gacaggttga acttcatccc caaaggagaa gctcaactca agcccaagag 3300  
 ctttgctaag gccctaacaa gccacacaaa gcaaaaagcc cactgggtca cgctaggaac 3360  
 caaaaggccc agcagtgatc cagccccaaa agagatctcc ttgccccgg agattacaat 3420  
 ggacgatttc ctctatcttt acgatctagg aaggaagttc gaaggtgaag gtgacgacac 3480  
 tatgttcacc actgataatg agaaggttag cctcttcaat ttcagaaaga atgctgaccc 3540  
 acagatgggt agagaggcct acgcagcagg tctcatcaag acgatctacc cgagtaacaa 3600  
 tctccaggag atcaaatacc ttccaagaa ggttaaagat gcagtcaaaa gattcaggac 3660  
 taattgcac aagaacacag agaaagacat atttctcaag atcagaagta ctattccagt 3720  
 atggacgatt caaggcttgc ttcataaacc aaggcaagta atagagattg gagtctctaa 3780  
 aaaggtagtt cctactgaat ctaaggccat gcatggagtc taagattcaa atcgaggatc 3840  
 taacagaact cgccgtgaag actggcgaac agttcataca gagtctttta cgactcaatg 3900  
 acaagaagaa aatcttcgtc aacatggtgg agcacgacac tctggtctac tccaaaaatg 3960  
 tcaaagatac agtctcagaa gaccaaagg ctattgagac ttttcaacaa aggataattt 4020  
 cgggaaacct cctcggattc cattgcccag ctatctgtca cttcatcgaa aggacagtag 4080  
 aaaaggaagg tggctcctac aaatgccatc attgcgataa aggaaaggct atcattcaag 4140  
 atgcctctgc cgacagtggc cccaaagatg gacccccacc cacgaggagc atcgtggaaa 4200  
 aagaagacgt tccaaccacg tcttcaaagc aagtggattg atgtgacatc tccactgacg 4260  
 taagggatga cgcacaatcc cactatcctt cgcaagaccc ttcctctata taaggaagtt 4320  
 catttcattt ggagaggaca cgctgaaatc accagtctct ctctataaat ctatctctct 4380  
 ctctataacc atggaccag aacgacgccc ggccgacatc cgccgtgcca ccgaggcgga 4440  
 catgccggcg gtctgcacca tcgtcaacca ctacatcgag acaagcacgg tcaacttccg 4500  
 taccgagccg caggaaccgc aggagtggac ggacgacctc gtccgtctgc gggagcgcta 4560  
 tccctggctc gtcgccgagg tggacggcga ggtgccggc atgcctacg cgggccccctg 4620  
 gaaggcacgc aacgcctacg actggacggc cgagtcgacc gtgtacgtct cccccgcca 4680

ccagcggacg ggactgggct ccacgtctta caccacctg ctgaagtccc tggaggcaca 4740  
 gggcttcaag agcgtgggtc cgtgcatcgg gctgccaac gacccgagcg tgcgcatgca 4800  
 cgaggcgctc ggatatgccc ccgcgggcat gctgcgggcg gccggcttca agcacgggaa 4860  
 ctggcatgac gtgggtttct ggcagctgga cttcagcctg ccggtaccgc cccgtccggt 4920  
 cctgcccgtc accgagatct gagatcacgc gttctaggat ccccgatga gctaagctag 4980  
 ctatatcatc aatttatgta ttacacataa tatcgactc agtctttcat ctacggcaat 5040  
 gtaccagctg atataatcag ttattgaaat atttctgaat ttaaacttgc atcaataaat 5100  
 ttatgttttt gcttggacta taatacctga cttgttattt tatcaataaa tatttaaact 5160  
 atatttcttt caagatggga attaacatct acaaattgcc tttcttatac gaccatgtac 5220  
 gtatcgcg 5228

<210> 4

<211> 2275

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> E1-barstar-3' nos

<400> 4

gaattcatat gcacgtgttc ccgatctagt aacatagatg acaccgcgcg cgataattta 60  
 tcctagtttg cgcgctatat ttgttttct atcgcgtatt aaatgtataa ttgcgggact 120  
 ctaatcataa aaacccatct cataaataac gtcattgatt acatgttaat tattacatgc 180  
 ttaacgtaat tcaacagaaa ttatatgata atcatcgcaa gaccggcaac aggattcaat 240  
 cttagaaac ttatttgcca aatgtttgaa cgatctgctt cggagggttac cttagaaag 300  
 tatgatggtg atgtcgagc cttccgcttt cgcttcacgg aaaacctgaa gcacactctc 360  
 ggcgccattt tcagtcagct gcttgctttg ttcaaactgc ctccattcca aaacgagcgg 420  
 gtactccacc catccggtca gacaatccca taaagcgtcc aggttttcac cgtagtattc 480

cggaagggca agctcctttt tcaatgtctg gtggaggctg ctgatacttc tgatttggtc 540  
 cccgttaatg actgcctttt tcatcgcgac ggcttgatgg atctcttgct ggacaccggg 600  
 atgctaggat gggttatcgt ggccggcggtg cgtgtgtggc ttttgtaggc gccggcgacg 660  
 gcgggggcaa tgtggcaggt gagtcacggt gcaagcgtgc gcaagtgact gcaacaacca 720  
 aggacggtca tggcgaaagc acctcacgcg tccaccgtct acaggatgta gcagtagcac 780  
 ggtgaaagaa gtgttgctcc gtccattagg tgcattctca ccgttgGCCa gaacaggacc 840  
 gtccaacagt taggttgagt gtaggacttt tacgtggta atgtatggca aatagtagta 900  
 aattttgccc ccattggctt ggctgagata gaacatattc tggaaagcct ctagcatatc 960  
 ttttttgaca gctaaacttt gcttcttgcc ttcttggctt agcaatgacg ttgcccatgt 1020  
 cgtggcaaac atctggtaag gtaactgtat tcgtttgttc cttcaacgg ctcaatcccc 1080  
 acaggccaag ctatcctttc ctggcagta taggctcctt gagagattat actaccattt 1140  
 ttaagtgcct ataaagacga tgctctctaa ccagatcgat cagaaacaca aagttttagc 1200  
 agcgtaatat cccacacaca tacacacacg aagctatgcc tcctcatttt ccgagagatt 1260  
 ctgacagtga ccagaatgtc agaatgcca ttcatgggca caagtcgatc cacaagcttc 1320  
 ttgggtggagg tcaaggtgtg ctattattat tcgctttcta ggaaattatt cagaattagt 1380  
 gcctttttatc ataacttctc tctgagccga tgtggttttg gatttcattg ttgggagcta 1440  
 tgcagttgcg gatattctgc tgtggaagaa caggaactta tctgcggggg tccttgctgg 1500  
 ggcaacattg atatggttcc tgttcgatgt agtagaatac aatataattc cgctcctttg 1560  
 ccagattgcc attcttgcca tgcttgatgt cttcatttgg tcaaatgccg caccactctt 1620  
 ggacaggtat tagctttatt tcctgtggag atggtagaaa actcagctta cagaaatggc 1680  
 atttcacgta gtataacgca agacattagg tactaaaact caactaactg ttccgaatt 1740  
 tcagggcccc tccaaggatc ccagaaatca tcatctctga acatgccttc agagaaatgg 1800  
 cattgaccgt ccattacaaa ctaacgtaca ctgtatctgt tctttacgac attgcatgtg 1860  
 gaaaggatct gaagagattt ctcttggtac ataataatct actcctttgc tacgttaata 1920  
 agagatgtaa aaacatgcaa cagttccagt gccaacattg tccaaggatt gtgcaattct 1980  
 ttctggagcg ctaaaattga ccagattaga cgcatcagaa tattgaattg cagagttagc 2040  
 caataatcct cataatgtta atgtgctatt gtgttccact actcaatata gttctggact 2100  
 aacaatcaga ttgtttatga tattaagggt gtggatctc tattggtatt gtcggcgatt 2160  
 ggaagttctt gcagcttgac aagtcacta tatattggta ggtattccag ataaatatta 2220

aattttaata aaacaatcac acagaaggat ctgcggccgc tagcctaggc ccggg 2275

<210> 5

<211> 7492

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Plasmid pTS346

<400> 5

aattcaagct tgacgtcagg tggcactttt cggggaaatg tgcgcggaac ccctatttgt 60  
 ttatTTTTCT aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg 120  
 cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt cggccttatt 180  
 ccctTTTTTG cggcattttg ccttcctgtt ttigtctacc cagaaacgct ggtgaaagta 240  
 aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc 300  
 ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag cacttttaaa 360  
 gttctgctat gtggcgCggt attatcccggt attgacgccg ggcaagagca actcggtcgc 420  
 cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt 480  
 acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca taaccatgag tgataacact 540  
 gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgac 600  
 aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac cggagctgaa tgaagccata 660  
 ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg caacaacgtt gcgcaaacta 720  
 ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat taatagactg gatggaggcg 780  
 gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg ctggctggtt tattgctgat 840  
 aaatctggag ccggigagcg tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggt 900  
 aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc aggcaactat ggatgaacga 960  
 aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc attggtaact gtcagaccaa 1020

gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt ttttaatttaa aaggatctag 1080  
 gtgaagatcc tttttggctc gagtctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcggtc 1140  
 cactgagcgt cagaccccgt agaaaagatc aaaggatctt ctigagatcc tttttttctg 1200  
 cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgctac cagcgggtgt ttgtttgccg 1260  
 gatcaagagc taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca 1320  
 aatactgtcc ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg 1380  
 cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg 1440  
 tgtcttaccg gggtggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga 1500  
 acgggggggtt cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac 1560  
 ctacagcgtg agcattgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat 1620  
 ccggtaaagc gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc 1680  
 tggatatctt atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga 1740  
 tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt ttacgggtc 1800  
 ctggcctttt gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg 1860  
 gataaccgta ttaccgcctt tgagttagct gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag 1920  
 cgcagcaggt cagttagcga ggaagcggaa gagcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc 1980  
 gcgcgttggc ctgatcagaa ttcatatgca cgtgttcccc atctagtaac atagatgaca 2040  
 ccgcgcgcga taatttatcc tagtttgcgc gctatatattt gttttctatc gcgtattaaa 2100  
 tgtataattg cgggactcta atcataaaaa cccatctcat aaataacgtc atgcattaca 2160  
 tgtaattat tacatgctta acgtaattca acagaaatta tatgataatc atcgcaagac 2220  
 cggcaacagg attcaatctt aagaaacttt attgccaaat gtttgaacga tctgcttcgg 2280  
 aggttacctt atctgatttt tgtaaaggct tgataatggt ccgttgtttt gtaaatcagc 2340  
 cagtcgcttg agtaaagaat ccggtctgaa tttctgaagc ctgatgtata gttaatatcc 2400  
 gcttcacgcc atgttcgtcc gcttttgccc gggagtgtgc cttccctgtt tgagaagatg 2460  
 tctccgccga tgcttttccc cggagcgacg tctgcaaggt tcccttttga tgccaccag 2520  
 ccgagggtt gtgcttctga ttttgtaatg taattatcag gtagcttatg atatgtctga 2580  
 agataatccg caaccccgctc aaacgtgttg ataaccggta ccatcgcgac ggcttgatgg 2640  
 atctcttgct ggacaccggg atgctaggat gggttatcgt ggccggcgtg cgtgtgtggc 2700  
 ttttgtaggc gccggcgacg gcgggggcaa tgtggcaggt gattcacggt gcaagcgtgc 2760



gcaagtgact gcaacaacca aggacggtca tggcgaaagc acctcacgcg tccaccgtct 2820  
 acaggatgta gcagtagcac ggtgaaagaa gtgttgctcc gtccattagg tgcattctca 2880  
 ccgttggcca gaacaggacc gtccaacagt taggttgagt gtaggacttt tacgtggta 2940  
 atgtatggca aatagtagta aattttgccc ccattggctt ggctgacaat tcatatgcac 3000  
 gtgttcccga tctagtaaca tagatgacac cgcgcgcgat aatttatcct agtttgcgcg 3060  
 ctatattttg tttctatcg cgtattaaat gtataattgc gggactctaa tcataaaaac 3120  
 ccatctcata aataacgtca tgcattacat gtttaattatt acatgcttaa cgtaattcaa 3180  
 cagaaattat atgataatca tcgcaagacc ggcaacagga ttcaatctta agaaacttta 3240  
 ttgccaaatg tttgaacgat ctgcttcgga ggttacctta agaaagtatg atggatgatg 3300  
 cgcagccttc cgctttcgct tcacggaaaa cctgaagcac actctcggcg ccattttcag 3360  
 tcagctgctt gctttgttca aactgcctcc attccaaaac gagcgggtac tccaccatc 3420  
 cggtcagaca atcccataaa gcgtccaggt tttaccgta gtattccgga agggcaagct 3480  
 cctttttcaa tgtctggtag aggtcgtga tacttctgat ttgttccccg ttaatgactg 3540  
 cttttttcat cgcgacggct tgatggatct cttgctggac accgggatgc taggatgggt 3600  
 tatcgtggcc ggcgtgcgtg tgtggctttt gtaggcgccg gcgacggcg gggcaatgtg 3660  
 gcaggtagat cacggtgcaa gcgtgcgcaa gtgactgcaa caaccaagga cggtcatggc 3720  
 gaaagcacct cacgcgtcca ccgtctacag gatgtagcag tagcacgggtg aaagaagtgt 3780  
 tgtcccgctc attaggtgca ttctaccgt tggccagaac aggaccgttc aacagttagg 3840  
 ttgagtgtag gacttttacg tggtaaattg atggcaaata gtagtaaatt ttgccccat 3900  
 tggctcggct gagatagaac atattctgga aagcctctag catatctttt ttgacagcta 3960  
 aactttgctt ctgccttct tggcttagca atgacgttgc ccatgtcgtg gcaaacatct 4020  
 ggtaaggtaa ctgtattcgt ttgttccctt caacggctca atccccacag gccaagctat 4080  
 cctttccttg gcagtatagg ctcttgaga gattatacta ccatttttaa gtgcttataa 4140  
 agacgatgct ctctaaccag atcgatcaga aacacaaagt ttagcagcg taatatccca 4200  
 cacacataca cacacgaagc tatgcctcct cattttccga gagattctga cagtgaccag 4260  
 aatgtcagaa tgccatttca tgggcacaag tcgatccaca agcttcttgg tggaggtcaa 4320  
 ggtgtgctat tattattcgc tttctaggaa attattcaga attagtgcct tttatcataa 4380  
 ctctctctg agccgatgtg gttttggatt tcatgttgg gagctatgca gttgcggata 4440  
 ttctgctgtg gaagaacagg aacttatctg cgggggtcct tgctggggca acattgatat 4500

ggcticctgtt cgatgtagta gaatacaata taattccgct cctttgccag attgccattc 4560  
 ttgccatgct tgtgatcttc atttggtaaa atgccgcacc actcttggac aggtatttagc 4620  
 tttatttcct gtggagatgg tagaaaactc agcttacaga aatggcattt cacgtagtat 4680  
 aacgcaagac attaggtact aaaactcaac taactgtttc cgaatttcag ggccccctcca 4740  
 aggatcccag aaatcatcat ctctgaacat gccttcagag aaatggcatt gaccgtccat 4800  
 taaaaactaa cgtacactgt atctgttctt tacgacattg catgtggaaa ggatctgaag 4860  
 agattttctc tggtagataa taatctactc ctttgctacg ttaataagag atgtaaaaac 4920  
 atgcaacagt tccagtgcc aattgtcca aggattgtgc aattctttct ggagcgctaa 4980  
 aattgaccag attagacgca tcagaatatt gaattgcaga gttagccaat aatcctcata 5040  
 atgttaatgt gctattgttg ttcactactc aatatagttc tggactaaca atcagattgt 5100  
 ttatgatatt aagggtggtg gatctctatt ggtattgtcg gcgattggaa gttcttgcag 5160  
 cttgacaagt ctactatata ttggtaggta ttccagataa atattaaatt ttaataaaaac 5220  
 aatcacacag aaggatctgc ggccgctagc ctaggcccg gcgctagcct aggcccgggc 5280  
 ccacaaaaat ctgagcttaa cagcacagtt gctcctctca gagcagaatc gggatttcaa 5340  
 caccctcata tcaactacta cgttgtgtat aacggtccac atgccggtat atacgatgac 5400  
 tggggttgta caaaggcggc aacaaacggc gttcccgag ttgcacacaa gaaatttgcc 5460  
 actattacag aggcaagagc agcagctgac gcgtacacaa caagtcagca aacagacagg 5520  
 ttgaacttca tccccaaagg agaagctcaa ctcaagccca agagctttgc taaggcccta 5580  
 acaagcccac caaagcaaaa agcccactgg ctacagctag gaacaaaaag gccagcagt 5640  
 gatccagccc caaaagagat ctcttttgcc ccggagatta caatggacga tttcctctat 5700  
 ctttacgac taggaaggaa gticgaaggt gaaggtgacg acactatgtt caccactgat 5760  
 aatgagaagg ttagcctctt caatttcaga aagaatgctg acccacagat ggtagagag 5820  
 gcciacgcag caggctctcat caagacgac tacccgagta acaatctcca ggagatcaaa 5880  
 taccttccca agaaggttaa agatgcagtc aaaagattca ggactaattg catcaagaac 5940  
 acagagaaa acatatttct caagatcaga agtactattc cagtatggac gattcaaggc 6000  
 ttgcttcata aaccaaggca agtaatagag attggagtct ctaaaaaggt agttcctact 6060  
 gaatctaagg ccatgcatgg agtctaagat tcaaactcag gatctaacag aactcgccgt 6120  
 gaagactggc gaacagtcca tacagagtct ttacgactc aatgacaaga agaaaatctt 6180  
 cgtcaacatg gtggagcacg acactctggt ctactccaaa aatgtcaaag atacagtctc 6240

agaagaccaa agggctattg agacttttca acaaaggata atttcgggaa acctcctcgg 6300  
 attccattgc ccagctatct gtcacttcat cgaaaggaca gtagaaaagg aaggtggctc 6360  
 ctacaaatgc catcattgcg ataaaggaaa ggctatcatt caagatgcct ctgccgacag 6420  
 tggccccaaa gatggacccc caccacagag gagcatcgtg gaaaaagaag acgttccaac 6480  
 cacgtcttca aagcaagtgg attgatgtga catctccact gacgtaaggg atgacgcaca 6540  
 atcccactat ccttcgcaag acccttccctc tatataagga agttcatttc atttgagag 6600  
 gacacgctga aatcaccagt ctctctctat aaatctatct ctctctctat aaccatggac 6660  
 ccagaacgac gcccgccga catccgccgt gccaccgagg cggacatgcc ggcggtctgc 6720  
 accatcgtca accactacat cgagacaagc acggtcaact tccgtaccga gccgcaggaa 6780  
 ccgcaggagt ggacggacga cctcgtccgt ctgcgggagc gctatccctg gctcgtcgcc 6840  
 gaggtggacg gcgaggtcgc cggcatcgcc tacgcgggcc cctggaaggc acgcaacgcc 6900  
 tacgactgga cggccgagtc gaccgtgtac gtctcccccc gccaccagcg gacgggactg 6960  
 ggctccacgc tctacacca cctgctgaag tccctggagg cacagggcct caagagcgtg 7020  
 gtcgtgtca tcgggctgcc caacgacccg agcgtgcgca tgcacgaggc gtcggatat 7080  
 gccccccgcg gcatgctgcg ggccggccggc ttcaagcacg ggaactggca tgacgtgggt 7140  
 ttctggcagc tggacttcag cctgccggta ccgccccgtc cggtcctgcc cgtcaccgag 7200  
 atctgagatc acgcgttcta ggatcccccg atgagctaag ctagctatat catcaattta 7260  
 tgtattacac ataatatcgc actcagtctt tcatctacgg caatgtacca gctgatataa 7320  
 tcagttattg aaatatttct gaatttaaac ttgcatcaat aaatttatgt ttttgcttgg 7380  
 actataatac ctgacttggt attttatcaa taaatattta aactataatt ctttcaagat 7440  
 gggaattaac atctacaaat tgccttttct tatcgacat gtacgtatcg cg 7492

<210> 6

<211> 1695

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<220>

<223> E1 pr moter

<400> 6

CCGCAGATCC	TTCTGTGTGA	TTGTTTTATT	AAAATTTAAT	ATTTATCTGG	AATACCTACC	60
AATATATAGT	AGACTTGTCA	AGCTGCAAGA	ACTTCCAATC	GCCGACAATA	CCAATAGAGA	120
TCCAACCACC	TTAATATCAT	AAACAATCTG	ATTGTTAGTC	CAGAACTATA	TTGAGTAGTG	180
AAACAACAATA	GCACATTAAC	ATTATGAGGA	TTATTGGCTA	ACTCTGCAAT	TCAATATTCT	240
GATGCGTCTA	ATCTGGTCAA	TTTTAGCGCT	CCAGAAAAGAA	TTGCACAATC	CTTGGACAAT	300
GTTGGCACTG	GAAGTGTGTC	ATGTTTTTAC	ATCTCTTATT	AACGTAGCAA	AGGAGTAGAT	360
TATTATGTAC	CAGGAGAAAT	CTCTTCAGAT	CCTTTCCACA	TGCAATGTCG	TAAAGAACAG	420
ATACAGTGTA	CGTTAGTTTG	TAATGGACGG	TCAATGCCAT	TTCTCTGAAG	GCATGTTTCT	480
AGATGATGAT	TTCTGGGATC	CTTGGAGGGG	CCCTGAAATT	CGGAAACAGT	TAGTTGAGTT	540
TTAGTACCTA	ATGTCTTGCG	TTATACTACG	TGAAATGCCA	TTTCTGTAAG	CTGAGTTTTT	600
TACCATCTCC	ACAGGAAATA	AAGCTAATAC	CTGTCCAAGA	GTGGTGCGGC	ATTGACCAA	660
ATGAAGATCA	CAAGCATGGC	AAGAATGGCA	ATCTGGCAAA	GGAGCGGAAT	TATATTGTAT	720
TCTACTACAT	CGAACAGGAA	CCATATCAAT	GTTGCCCCAG	CAAGGACCCC	CGCAGATAAG	780
TTCTGTCTCT	TCCACAGCAG	AATATCCGCA	ACTGCATAGC	TCCCAACAAT	GAAATCCAAA	840
ACCACATCGG	CTCAGAGAGA	AGTTATGATA	AAAGGCACTA	ATTCTGAATA	ATTCCTAGA	900
AAGCGAATAA	TAATAGCACA	CCTTGACCTC	CACCAAGAAG	CTTGTGGATC	GACTTGTGCC	960
CATGAAATGG	CATTCTGACA	TTCTGGTCAC	TGTCAGAATC	TCTCGGAAAA	TGAGGAGGCA	1020
TAGCTTCGTG	TGTGTATGTG	TGTGGGATAT	TACGCTGCTA	AAACTTTGTG	TTTCTGATCG	1080
ATCTGGTTAG	AGAGCATCGT	CTTTATAAGC	ACTTAAAAAT	GGTAGTATAA	TCTCTCAAGG	1140
AGCCTATACT	GCCAAGGAAA	GGATAGCTTG	GCCTGTGGGG	ATTGAGCCGT	TGAAGGGAAC	1200
AAACGAATAC	AGTTACCTTA	CCAGATGTTT	GCCACGACAT	GGGCAACGTC	ATTGCTAGAC	1260
CAAGAAGGCA	AGAAGCAAAG	TTTAGCTGTC	AAAAAAGATA	TGCTAGAGGC	TTCCAGAAT	1320
ATGTTCTATC	TCAGCCAGAC	CAATGGGGGC	AAAATTTACT	ACTATTTGCC	ATACATTAAC	1380
CACGTAAAAG	TCCTACACTC	AACCTAACTG	TTGAACGGTC	CTGTTCTGGC	CAACGGTGAG	1440
AATGCACCTA	ATGGACGGGA	CAACACTTCT	TTCACCGTGC	TACTGCTACA	TCCTGTAGAC	1500
GGTGGACGCG	TGAGGTGCTT	TCGCCATGAC	CGTCCTTGGT	TGTTGCAGTC	ACTTGCGCAC	1560

GCTTGCACCG TGA CT CACCT GCCACATTGC CCCC GCCGTC GCCGGCGCCT AAAAAAGCCA 1620  
CACACGCACG CCGGCCACGA TAACCCATCC TAGCATCCCG GTGTCCAGCA AGAGATCCAT 1680  
CAAGCCGTCG CGATG 1695

<210> 7

<211> 365

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> deleted E1 promoter

<400> 7

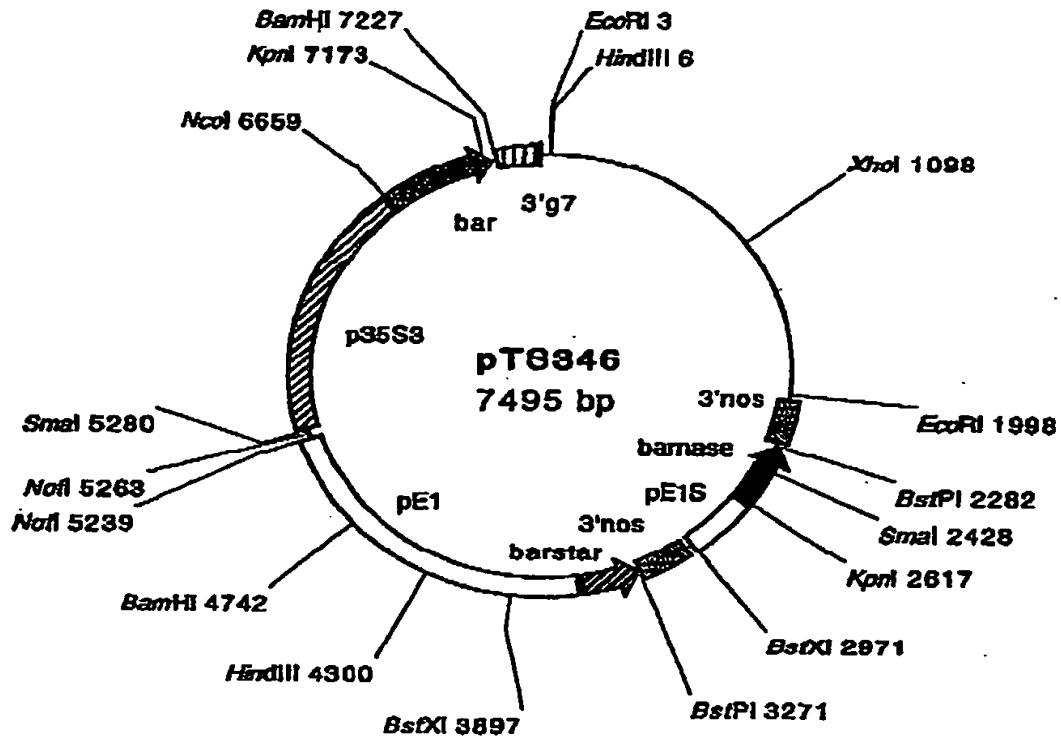
TCAGCCAGAC CAATGGGGGC AAAATTTACT ACTATTTGCC ATACATTAAC CACGTAAAAG 60  
TCCTACACTC AACCTAACTG TTGAACGGTC CTGTTCTGGC CAACGGTGAG AATGCACCTA 120  
ATGGACGGGA CAACACTTCT TTCACCGTGC TACTGCTACA TCCTGTAGAC GGTGGACGCG 180  
TGAGGTGCTT TCGCCATGAC CGTCCTTGGT TGTTGCAGTC ACTTGCGCAC GCTTGCACCG 240  
TGA CT CACCT GCCACATTGC CCCC GCCGTC GCCGGCGCCT AAAAAAGCCA CACACGCACG 300  
CCGGCCACGA TAACCCATCC TAGCATCCCG GTGTCCAGCA AGAGATCCAT CAAGCCGTCG 360  
CGATG 365

【図面の簡単な説明】

【図 1】 pIS346の構造を、模式的に示す図である。

【書類名】 図面

【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 雄性不稔性であることを除く原品種と同様な正常な形態を示す雄性不稔植物を作出する方法を提供する。

【解決手段】 RNA分解酵素遺伝子上流にプロモーターの断片を結合し、RNA分解酵素阻害蛋白遺伝子上流に前記プロモーターと同一又は異なるプロモーターを結合し、植物ゲノム中に導入することにより、当該植物を実質的に雄性不稔化することを特徴とする雄性不稔植物の作出方法。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000004569]

1. 変更年月日 1995年 5月16日

[変更理由] 住所変更

住 所 東京都港区虎ノ門二丁目2番1号

氏 名 日本たばこ産業株式会社